

氏 名	あか し まこと 明 石 真
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2528 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	哺乳類培養細胞における概日時計の分子機構の解析

論文調査委員 (主 査)
教 授 西 田 栄 介 教 授 平 野 丈 夫 教 授 七 田 芳 則

論 文 内 容 の 要 旨

概日時計は、ほとんど全ての生物に存在する基本的生命現象である。概日時計の周期は完全に24時間に一致しない。光などの外的環境因子により内的時間の位相変化を引き起こし外的時間に同調することによって、正確に24時間の周期を保っている。哺乳類の概日時計の中樞は suprachiasmatic nucleus (SCN) にある。SCN における時計遺伝子の発現量には、およそ24時間周期の変動がみられる。概日時計の約24時間周期の振動現象は、時計遺伝子の転写のネガティブフィードバックループによって引き起こされている。哺乳類においては、転写因子 CLOCK と BMAL1 がヘテロ二量体を形成し、転写抑制因子 Period や Cryptochrome の発現を誘導する。Period や cryptochrome は CLOCK : BMAL1 の転写活性を阻害する。

本論文の前半では、概日時計の同調シグナルによって活性化する細胞内情報伝達経路を、SCN のモデル系として、培養繊維芽細胞を用いて解析した。近年、Rat1 繊維芽細胞に血清刺激を行うと、光同調の際に SCN で見られるような前初期遺伝子の発現をとめない、遺伝子発現の概日変動が引き起こされることが報告されている。まず、NIH3T3 繊維芽細胞に血清刺激を行うと、同じ現象を再現することが出来た。さらに、TPA 処理には、血清刺激と同様な効果があることを見出した。また、この TPA 処理の効果が、MAP キナーゼ活性化因子である MEK の阻害剤によって抑制されることを示した。さらに、MAP キナーゼカスケードの持続的活性化が、Period1 を含む前初期遺伝子の発現および概日周期遺伝子発現を引き起こすのに十分であることも見出した。以上のことから、同調シグナルによる MAP キナーゼの活性化が、概日時計の同調のシグナル伝達に関与していることが示唆された。

本論文の後半では、哺乳類概日時計において必須な因子であることが示唆されてきた Casein kinase Iε および δ が、概日時計を形成する転写因子や転写抑制因子をどのように制御しているのかを解析した。まず、転写抑制因子と考えられている Period タンパク質が、CKI の特異的な基質になっていることを明らかにした。他の時計遺伝子産物と CKI の相互作用は認められなかった。また、Period タンパク質は、CKI によるリン酸化により急速な分解を受け、この分解はユビキチン・プロテアソーム経路に依存していることが示された。さらに、CKI は Period タンパク質の核移行を引き起こし、この核移行は CKI によるリン酸化および Period タンパク質上の核移行シグナルの両方に依存していることが示唆された。Period タンパク質のリン酸化サイトと思われる部位に変異を入れると、CKI による核移行および分解の両方が減少した。CKI は、BMAL1・CLOCK の転写活性に対する Period タンパク質の阻害効果に影響を与えた。これらの結果は、CKIε および δ は、Period タンパク質の半減期および細胞内局在を制御することによって、哺乳類概日時計を調整していることを示唆している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、概日時計の形成に関与する、数々の「時計遺伝子」が同定されてきており、その遺伝子産物の機能解析が急速に進んでいる。また、概日時計の分子メカニズムの解析が進むにつれ、ヒト睡眠障害の発症のメカニズムと時計遺伝子の機能と

の関連が注目されるようになった。このように、概日時計の分子レベルでの解析は、単なる基本的生命現象の解明にとどまらず、概日時計の機能不全により引き起こされる病気の分子的理解および治療法に役立つ可能性がある。本申請論文は、このように生命科学の重要課題の一分野である概日時計研究において、大きく貢献するものであると思われる。

Rat1 繊維芽細胞に血清刺激を与えると、概日時計の光同調に似た現象が引き起こされることが発見されていた。申請者は、この現象を NIH3T3 繊維芽細胞において再現することに成功した。また、細胞外と同調刺激の下流において、MAP キナーゼが関与している可能性を示唆した。さらに興味深いことに、培養細胞において MAP キナーゼカスケードを活性化すると、光同調に類似した現象が引き起こされることがわかった。これらの実験結果は、MAP キナーゼカスケードが、概日時計の同調に関与する細胞内情報伝達を担っている可能性を示唆している。申請者の実験は、概日時計の分子メカニズムの解析を、動物個体を用いた複雑な実験系だけでなく、培養細胞というシンプルな実験系でも可能であるということを示唆するものである。また、実際にこの実験系で解析を行い、MAP キナーゼ情報伝達経路が概日時計の同調に関与していることを示しており、この結果は概日時計の同調に関与する細胞内情報伝達経路の解明に大きく貢献するものと思われる。さらに、多くの生命現象において重要な役割を持つ MAP キナーゼカスケードの新しい機能を提唱するものであり、非常に価値の高い報告と考えられる。

次に、申請者は、最近の数々の報告によって、哺乳類概日時計において不可欠な因子であることが示されてきた CKI ϵ および δ が、どのように概日時計の形成に関わっているのか、その分子メカニズムを解析した。その結果、CKI ϵ および δ は Period タンパク質の半減期および細胞内局在を制御することによって、哺乳類概日時計を調整していることを詳細にわたり解析し、明らかにした。最近の研究では、CKI や Period タンパク質における変異により、CKI による Period タンパク質のリン酸化に変化が起こった結果、ヒトの睡眠障害が引き起こされる事を示唆する報告がなされている。申請者の実験結果は、これらの報告を、生化学および細胞生物学的なアプローチで裏付けるものであり、非常に価値が高い。

以上、本申請論文は、概日時計の同調の分子メカニズム、および時計の振動体における CKI の役割について解析を行ったものであり、博士（理学）の学位論文として十分に価値があるものと認められる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について口頭試問を行った結果、合格と認めた。